



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 501 215 A2**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: **92102197.8**

51 Int. Cl.<sup>5</sup>: **C12N 15/62, A61K 47/48,  
C12N 15/56, C12P 21/08**

22 Anmeldetag: **10.02.92**

30 Priorität: **28.02.91 DE 4106389**

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**02.09.92 Patentblatt 92/36**

64 Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT  
SE**

71 Anmelder: **BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
W-3550 Marburg 1(DE)**

72 Erfinder: **Seemann, Gerhard  
Weissdornweg 32  
W-3550 Marburg-Einhausen(DE)  
Erfinder: Bosslet, Klaus  
Am Schlag 5  
W-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Czech, Jörg  
Höhenweg 3  
W-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Kolar, Cenek  
Deutschhausstrasse 20  
W-3550 Marburg(DE)  
Erfinder: Hoffmann, Dieter  
Feuerdornweg 12  
W-3550 Marburg-Einhausen(DE)  
Erfinder: Sedlacek, Hans-Harald  
Sonnenhang 3  
W-3550 Marburg(DE)**

54 **Monoklonalantikörper, Linker- und Beta-Glucuronidase enthaltende Fusionsproteine zur Prodrug-Aktivierung, ihre Herstellung und Verwendung.**

57 Die Erfindung betrifft Fusionsproteine für die Prodrug-Aktivierung der allgemeinen Formel huTuMAK-L- $\beta$ -Gluc, wobei huTuMAK für einen humanisierten oder humanen tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment davon steht, L einen Linker bedeutet und  $\beta$ -Gluc humane  $\beta$ -Glucuronidase beinhaltet. Diese Fusionsproteine werden gentechnisch hergestellt. huTuMAK sorgt für die spezifische Lokalisation von Tumoren, L verbindet huTuMAK mit  $\beta$ -Gluc in einer Weise, welche die spezifischen Eigenschaften beider Fusionspartner nicht behindert und  $\beta$ -Gluc aktiviert eine geeignete Prodrug-Verbindung durch Abspaltung von Glucuronsäure, wobei durch die humanisierten bzw. humanen Fusionspartner ein nahezu autologes System zur Anwendung im Menschen bereitsteht.

EP 0 501 215 A2

Die Erfindung betrifft Fusionsproteine für die Prodrug-Aktivierung der allgemeinen Formel huTuMAK-L- $\beta$ -Gluc, wobei huTuMAK für einen humanisierten oder humanen tumorspezifischen monoklonalen Antikörper, ein Fragment oder ein Derivat davon steht, L einen Linker bedeutet und  $\beta$ -Gluc humane  $\beta$ -Glucuronidase beinhaltet. Diese Fusionsproteine werden gentechnisch hergestellt. huTuMAK sorgt für die spezifische Lokalisation von Tumoren, L verbindet huTuMAK mit  $\beta$ -Gluc in einer Weise, welche die spezifischen Eigenschaften beider Fusionspartner nicht behindert und  $\beta$ -Gluc aktiviert eine geeignete Prodrug-Verbindung durch Abspaltung von Glucuronsäure, wobei durch die humanisierten bzw. humanen Fusionspartner ein nahezu autologes System zur Anwendung im Menschen bereitsteht.

Die Kombination von Prodrug und tumorspezifischen Antikörper-Enzym-Konjugaten zur Anwendung als therapeutische Mittel ist in der Fachliteratur beschrieben. Hierbei wurden gegen bestimmtes Gewebe gerichtete Antikörper, an die ein Prodrug-spaltendes Enzym kovalent gebunden sind, einem Tier, welches das transplantierte Gewebe enthält, injiziert, und anschließend wird eine Enzym-aktivierbare Prodrug-Verbindung verabreicht. Unter der Einwirkung des am Gewebe verankerten Antikörper-Enzym-Konjugates wird die Prodrug-Verbindung zum Zellgift umgewandelt, das eine zytotoxische Wirkung gegen das transplantierte Gewebe ausübt.

In WO 88/07378 ist ein zwei Komponenten enthaltendes therapeutisches System, bestehend aus einer Antikörper-Enzym-Komponente beschrieben. Zur Herstellung der Antikörper-Enzym-Konjugate wird hierbei die Verwendung von Nicht-Säuger-Enzymen beschrieben und die von endogenen Enzymen aufgrund der unspezifischen Wirkstoff-Freisetzung ausgeschlossen. Da die exogenen Enzyme von dem Organismus als Fremddantigene erkannt werden, ist deren Verwendung mit dem Nachteil einer Immunantwort gegenüber diesen nicht körpereigenen Stoffen verbunden, aufgrund deren das am Antikörper immobilisierte Enzym deaktiviert und gegebenenfalls das ganze Konjugat eliminiert wird. Weiterhin werden hier p-Bis-N-(2-chlorethyl)-aminobenzylglutaminsäure und deren Derivate als Prodrug verwendet, deren chemische Halbwertszeit nur 5,3 bis 16,5 Stunden beträgt. Die chemische Instabilität einer Prodrug-Verbindung ist aufgrund der zu erwartenden Nebenwirkungen von Nachteil.

In EP A2-0 302 473 wird ebenfalls ein zwei Komponenten enthaltendes therapeutisches System beschrieben, in dem das am Tumorgewebe lokalisierte Antikörper-Enzym-Konjugat eine Prodrug-Verbindung zu einem zytotoxischen Wirkstoff spaltet. Die hierbei unter anderem beschriebene kombinierte Verwendung von Etoposid-4'-phosphat und deren Derivaten als Prodrug und antikörperimmobilisierten alkalischen Phosphatasen zur Freisetzung der Etoposide ist aufgrund der starken Präsenz von endogenen alkalischen Phosphatasen im Serum von Nachteil. Wie in DE A1-38 26 562 beschrieben, werden bereits die Etoposid-4'-phosphate alleinig als therapeutisches Antitumormittel angewandt, wobei die im Serum präsenten Phosphatasen das Etoposid aus dem Prodrugs freisetzen.

Es wurde gefunden, daß huTuMAK's gekoppelt über L an  $\beta$ -Gluc und gentechnisch hergestellt ein besonders vorteilhaftes, da nahezu autologes System darstellen. Zusätzlich wurde gefunden, daß die katalytische Aktivität der  $\beta$ -Gluc im Fusionsprotein bei pH 7.4 (d. h. physiologischen Bedingungen) signifikant höher ist als die des nativen Enzyms, wenn das Fusionsprotein über die V-Region an das Antigen gebunden ist. Ferner läßt sich ein Fusionsprotein mit nur einer Hinge Region (siehe Fig. P und Beispiel O) gentechnisch mit hoher Ausbeute erzeugen, da die Hauptmenge des gebildeten Produkts als eine Bande (hier mit Molekulargewicht 125 000) anfällt und per Affinitätschromatographie über anti-idiotypische MAK bzw. Anti-Glucuronidase- MAK leicht zu reinigen ist.

Ferner wurde gefunden, daß eine chemische Modifizierung der Fusionsproteine, insbesondere eine teilweise oder vollständige Oxidation der Kohlenhydratstrukturen vorzugsweise mit einer nachfolgenden reduktiven Aminierung zu einer verlängerten Halbwertszeit führt. Eine enzymatische Behandlung der erfindungsgemäßen Fusionsproteine mit alkalischer Phosphatase aus z. B. Rinderdarm oder E. coli führte im allgemeinen zu keiner signifikanten Verlängerung der Halbwertszeit.

Die Erfindung betrifft folglich Fusionsproteine der Formel

huTuMAK-L- $\beta$ -Gluc (I)

wobei huTuMAK einen humanisierten oder humanen tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein Fragment oder ein Derivat davon bedeutet, und bevorzugt die in der EP-A1-0 388 914 beschriebenen MAK umfaßt.

Besonders bevorzugt ist das humanisierte MAK Fragment mit den  $V_L$  und  $V_H$  Genen gemäß Tabelle 3 in den erfindungsgemäßen Fusionsproteinen enthalten.

Tab.3

431/26 VH hum

5  
 10  
 15  
 20  
 25

```

      10      30      50
caactgcaggagagcgggtccaggtcttgtgagacctagccagaccctgagcctgacctgc
GlnLeuGlnGluSerGlyProGlyLeuValArgProSerGlnThrLeuSerLeuThrCys
      70      90     110
accgtgtcttggttcaccatcagcagtggttatagctggcactgggtgagacagccacct
ThrValSerGlyPheThrIleSerSerGlyTyrSerTrpHisTrpValArgGlnProPro
     130     150     170
ggacgaggtcttgagtggattggatacatacagtacagtgggtatcactaaactacaacccc
GlyArgGlyLeuGluTrpIleGlyTyrIleGlnTyrSerGlyIleThrAsnTyrAsnPro
     190     210     230
tctctcaaaagtagagtgacaatgctggtagacaccagcaagaaccagttcagcctgaga
SerLeuLysSerArgValThrMetLeuValAspThrSerLysAsnGlnPheSerLeuArg
     250     270     290
ctcagcagcgtgacagccgcccacccgcggtctattattgtgcaagagaagactatgat
LeuSerSerValThrAlaAlaAspThrAlaValTyrTyrCysAlaArgGluAspTyrAsp
     310     330     350
taccactggtacttcgatgtctgggggtcaaggcagcctcgtcacagtctcctca
TyrHisTrpTyrPheAspValTrpGlyGlnGlySerLeuValThrValSerSer
  
```

431/26 VK hum

30  
 35  
 40  
 45  
 50

```

      10      30      50
ggtgtccactccgacatccagatgaccagagcccaagcagcctgagcgccagcgtgggt
GlyValHisSerAspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerValGly
      70      90     110
gacagagtgaccatcacctgtagtaccagctcgagtgttaagttacatgcactggtaccag
AspArgValThrIleThrCysSerThrSerSerSerValSerTyrMetHisTrpTyrGln
     130     150     170
cagaagccaggttaaggctccaaagctgctgatctacagcacatccaacctggcttctggt
GlnLysProGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrSerThrSerAsnLeuAlaSerGly
     190     210     230
gtgccaagcagattcagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcggtagcgg
ValProSerArgPheSerGlySerGlyThrAspPheThrPheThrIleSerSer
     250     270     290
ctccagccagaggacatcgccacctactactgccatcagtgaggtagttatcccacgttc
LeuGlnProGluAspIleAlaThrTyrTyrCysHisGlnTrpSerSerTyrProThrPhe
     310     330
ggccaagggaccaaggtggaaatcaaactg
GlyGlnGlyThrLysValGluIleLysArg
  
```

L bedeutet Linker und enthält vorzugsweise eine Hinge-Region eines Immunglobulins, die über eine Peptidsequenz mit dem N-Terminus des reifen Enzyms verbunden ist.

55  $\beta$ -GluC bedeutet die vollständige Aminosäuresequenz der humanen  $\beta$ -Glucuronidase bzw. in den zugehörigen Gen-Konstrukten die vollständige cDNA (Oshima A. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84, (1987) 685-689).

Bevorzugt sind ferner Konstrukte mit einem CH<sub>1</sub>-Exon und einem Hinge-Exon im Antikörperteil,

besonders bevorzugt sind Konstrukte, in denen diese Teile aus einem humanen IgG3 C-Gen stammen. Am meisten bevorzugt sind Konstrukte, gemäß Beispiel (I), wobei die entsprechende leichte Kette des humanisierten TuMAK's coexprimiert wird, um so einen in den Bindungseigenschaften des ursprünglichen TuMAK's möglichst gleichen huTuMAK-Anteil zu erhalten. Die Erfindung betrifft schließlich Verfahren für die

5 gentechnische Herstellung vorgenannter Fusionsproteine, ihre Reinigung sowie ihre Verwendung als Arzneimittel. Fusionsproteine wie beschrieben können zur Prodrug-Aktivierung bei Tumorerkrankungen eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen Fusionsproteine chemisch modifiziert, um eine verlängerte Halbwertszeit und somit eine verbesserte Lokalisation von Tumoren zu erreichen.

10 Vorzugsweise werden die Fusionsproteine mit einem Oxidationsmittel, z. B. Periodat, behandelt, was im allgemeinen zu einer teilweisen oder vollständigen Spaltung der Kohlenhydratringe und somit zu einer Veränderung der Kohlenhydratstruktur führt. Diese Veränderung führt im allgemeinen zu einer verlängerten Halbwertszeit. Weiterhin ist es vorteilhaft in einem zweiten Reaktionsschritt bestehende Aldehydgruppen zu derivatisieren, beispielsweise durch reduktive Aminierung. Die teilweise oder vollständige Zerstörung der

15 Aldehydgruppen führt im allgemeinen zu einer Reduzierung möglicher Nebenreaktionen mit beispielsweise Plasmaproteinen.

Demzufolge ist es vorteilhaft, die erfindungsgemäßen Fusionsproteine in einen ersten Reaktionsschritt beispielsweise mit Periodat zu oxidieren und in einem zweiten Reaktionsschritt beispielsweise mit Ethanolamin und Cyanoborhydrid reduktiv zu aminieren.

20 Die nachfolgenden Beispiele beschreiben die gentechnische Synthese eines besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Fusionsproteins, deren Derivatisierung sowie den Nachweis der Funktionsfähigkeit beider Fusionspartner.

#### Beispiel (A):

25

Ausgangsmaterial war das Plasmid pGEM4-HUGP13 (Fig. A). pGEM4-HUGP13 enthält ein cDNA Insert, welches die vollständige kodierende Sequenz für das Enzym humane  $\beta$ -Glucuronidase enthält (Oshima et al. a.a.O.). Alle verwendeten Techniken wurden Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor USA (1989) entnommen.

30

#### Beispiel (B):

Das Plasmid pGEM4-HUGP13 wurde mit den Restriktionsendonukleasen Pst1 und SalI geschnitten und das 342bp lange Pst1/SalI Fragment, welches die NotI Restriktionsschnittstelle trägt, isoliert. Das Pst1/SalI

35 Fragment wurde in den Pst1/SalI gespaltenen Vektor pTZ (Fig. B.1) kloniert und der Klon pTZ $\beta$ Glc350 isoliert (Fig. B.2).

#### Beispiel (C):

40 Der Plasmidklon pTZ $\beta$ Glc350 wurde mit Pst1 gespalten und das doppelsträngige DNA-Fragment  $\beta$ Glc Linker, welches aus den Oligonukleotiden  $\beta$ Glc Linker 1 und  $\beta$ Glc Linker 2 besteht (Tab. 1) und kohäsive Pst1 Enden besitzt, in die geöffnete Pst1 Schnittstelle ligiert.

45

50

55

Tab. 1

5

 $\beta$ Glc Linker 1:

10

5' 3'  
GCG GCG GCG GCG CTG CA

15

 $\beta$ Glc Linker 2:

20

5' 3'  
 CCG CCG CCG CCG CTG CA

Es wurde der Klon pTZ $\beta$ Glc370 isoliert, bei dem das  $\beta$ -Glucuronidase Fragment an seinem 5' Ende um das Oligonukleotid I verlängert ist und das die vorher vorhandene Pst1 Schnittstelle verloren, dafür aber an seinem 5' Ende eine neue Pst1 Schnittstelle erhalten hat

**Beispiel (D):**

Der Plasmidklon pTZ $\beta$ Glc370 wurde mit Pst1 gespalten und mit dem aus den Hinge-Oligonukleotiden 1 und 2b bestehenden Hinge-Linker-Fragment (Tab. 2), welches zwei kohäsive Pst1 Enden besitzt, ligiert. Dabei wird die Pst1 Schnittstelle am 5' Endes des  $\beta$ Glc370 Fragmentes zerstört. Es wurde der Plasmidklon pTZ $\beta$ Glc420 isoliert, bei dem das  $\beta$ Glc Insert am 5' Ende um den Hinge-Linker H verlängert ist (Fig. D).

35

Tab. 2

Hinge 1 Oligo:

40

5'  
 GAG CCC AAA TCT TGT GAC ACA CCT CCC CCG TGC CCA  
 3'  
 CGG TGC CCA GTT GCA

45

Hinge 2b Oligo:

50

5'  
 ACT GGG CAC CGT GGG CAC GGG GGA GGT GTG TCA CAA  
 3'  
 GAT TTG GGC TCT GCA

55

**Beispiel (E):**

Das Plasmid pTZ $\beta$ Glc420 wurde mit Pst1 und Sal1 gespalten und das 420bp Insert isoliert. Das Plasmid IgG3c F(ab')<sub>2</sub> 2H (EP-A2-O 352 761, Fig. 3, ibidem), welches das CH<sub>1</sub> Exon und zwei Hinge Exons eines humanen IgG3 C-Gens enthält, wurde vollständig mit Sal1 und partiell mit Pst1 gespalten. Mit diesem Sall/Pst1(part.) gespaltenen Plasmid wurde das isolierte 420bp Insert ligiert und der Plasmidklon isoliert, der das CH<sub>1</sub> Exon, ein Hinge Exon und das  $\beta$ Glc420 Fragment enthält, zwischen CH<sub>1</sub> Exon und  $\beta$ -Glucuronidase also die genetische Information zweier Hinge Exons trägt (pUC CH<sub>1</sub> + H +  $\beta$ Glc420) (Fig. E).

**Beispiel (F):**

Das Plasmid pGEM4-HUGP13 $\beta$ Glc wurde mit Sall gespalten und das 1750bp Sall-Fragment aus der  $\beta$ -Glucuronidase cDNA isoliert. Das isolierte 1750bp Sall-Fragment wurde mit dem Sall-gespaltenen Plasmid pUC CH<sub>1</sub> + H +  $\beta$ Glc430 ligiert. Es wurde der Plasmidklon pUC CH<sub>1</sub>/ $\beta$ Gluc isoliert, der ein Fusionsgen aus einem CH<sub>1</sub> Exon, einem Hinge Exon und einem Fusionsexon zwischen einem Hinge Exon und der humanen  $\beta$ -Glucuronidase cDNA enthält (Fig. F).

**Beispiel (G):**

Der Expressionsvektor pABstop (Fig. I.1) wurde mit HindIII und Sal1 gespalten. Das Plasmid pUC CH<sub>1</sub> + H + hu $\beta$ Glc wurde mit HindIII vollständig und mit Sal1 partiell gespalten und das CH<sub>1</sub> + H + hu $\beta$ Glc Insert isoliert. Das CH<sub>1</sub> + H + hu $\beta$ Glc Insert wurde mit dem HindIII/ Sal1-gespaltenen pABstop ligiert und der Klon pABstop CH<sub>1</sub> + H + hu $\beta$ Glc isoliert (Fig. G).

**Beispiel (H):**

Der pABstop Vektor pABstop BW 431/26 hum V<sub>H</sub>, der die humanisierte Version des V<sub>H</sub>-Gens des anti CEA MAK BW 431/26 (Bosslet K. et al., Eur.J.Nucl.Med. 14, (1988) 523-528) enthält (Sequenzen des humanisierten V<sub>H</sub>- und V<sub>K</sub>-Gens siehe Tab. 3), wurde mit HindIII und BamHI gespalten und das Insert, welches das Signalexon und das V<sub>H</sub>-Exon enthält, isoliert. Der Plasmidklon pABstop CH<sub>1</sub> + H + hu $\beta$ Glc wurde mit HindIII gespalten und mit den HindIII/BamHI 431/26 hum V<sub>H</sub>-Fragment ligiert. Nach 2 h Ligation bei Raumtemperatur wurde die Ligation durch 10' Inkubation bei 70° C gestoppt, die noch freien Enden mit Klenow Polymerase und dNTPs aufgefüllt. Dann wurde über Nacht weiterligiert. Nach Transformation wurde mit Hilfe von Restriktionskartierung und Nukleinsäuresequenzanalyse der Klon  $\beta$ ABstop 431/26 hum V<sub>H</sub> hu $\beta$ Glc1H isoliert, der ein Immunglobulin F(ab')<sub>2</sub> Gen mit einem Hinge-Exon enthält, das mit dem kodierenden Bereich der humanen  $\beta$ -Glucuronidase fusioniert ist (Fig. H).

**Beispiel (I):**

Der Klon pABstop 431/26 hum V<sub>H</sub> hu $\beta$ Glc1H wurde zusammen mit einem Plasmidklon, der die leichte Kette des humanisierten BW 431/26 trägt (Fig. J) und zwei Plasmiden, die ein Neomycin- (Fig. K) bzw. ein Methotrexat-Resistenzgen (Fig. L) tragen, in BHK Zellen transfiziert. Es wurde ein Fusionsprotein ausgeprägt, das sowohl die Antigenbindungseigenschaften des MAK BW 431/26hum als auch die enzymatische Aktivität der humanen  $\beta$ -Glucuronidase hat.

**Beispiel J:****Nachweis der Antigenbindungseigenschaften und der enzymatischen Aktivität des 431/26hum V<sub>H</sub>hu $\beta$ Glc 1H Fusionsproteins**

Die Fähigkeit des 431/26hum V<sub>H</sub>hu $\beta$ Glc 1H Fusionsproteins spezifisch an das durch den 431/26 definierte Epitop auf CEA (Carcinoembryonic Antigen) zu binden und gleichzeitig die enzymatische Aktivität der humanen  $\beta$ -Glucuronidase auszuüben, wurde in einem Spezifitäts-Enzymaktivitätstest bestimmt. Dieser Test wird wie im folgenden

beschrieben durchgeführt:

- Polystyrol (96 well) Mikrotitrationsplatten (U-Form, Typ B, Fa. Nunc, Best.-Nr. 4-60445) werden mit gereinigtem CEA (1-5  $\mu$ g CEA/ml, hiervon 75  $\mu$ l/Vertiefung) oder mit GIT-Mucin (gleiche Menge wie CEA) über Nacht bei R.T. inkubiert.

- Das nicht adsorbierte Antigen wird abgesaugt und 3x mit 0.05 M Tris-Citrat-Puffer, pH 7.4, gewaschen.
  - Die Mikrotitrationsplatten werden über Nacht mit der Öffnung nach unten auf Zellstoff bei R.T. stehen gelassen.
  - 5 - Die Mikrotitrationsplatten werden 30 Minuten bei 20 ° C mit 250 µl 1%iger Caseinlösung in PBS, pH 7.2 /well inkubiert (Blockierungslösung).
  - Während des Blockierens wird das Substrat angesetzt. Die Menge des Substrates richtet sich nach der Zahl der zu testenden Überstände. Das Substrat wird für jeden Test frisch angesetzt.  
Substrat: 4-Methylumbelliferyl  $\beta$ -D-Glucuronide (Best.-Nr.: M-9130 bei Fa. Sigma), 2.5 mM in 200 mM NaAcetatpuffer, pH 5.0, mit 0.01 % BSA
  - 10 - Die Blockierungslösung wird abgesaugt und je 50 µl BHK-Zellüberstand, welcher das Fusionsprotein enthält, wird auf die mit CEA- bzw. GIT-Mucin gecoatete Mikrotitrationsplatte aufgetragen (benötigtes Probenvolumen also mindestens 120 µl).
  - Anschließend wird 30 Minuten bei R.T. inkubiert.
  - 15 - Die Platten werden 3x mit ELISA-Waschpuffer (Behring, OSEW 96) gewaschen.
  - Das Substrat wird aufgetragen (50 µl/well) und 2 Stunden bei 37 ° c inkubiert. Wegen möglicher Verdunstung wird die Platte abgedeckt.
  - Nach 2 Stunden werden 150 µl Stopplösung/well pipettiert (Stopplösung = 0,2 M Glycin + 0,2 % SDS, pH 11.7).
  - 20 - Die Auswertung kann nun unter einer UV-Lampe (Anregungsenergie 380 nm) oder in einem Fluoreszenzmessgerät. (Fluoroscan II, ICM- Biomedicals, Kat-Nr.: 78-611-00) erfolgen.
- Mittels dieses Spezifitäts-Enzymaktivitätstests konnte gezeigt werden, daß in den mit CEA beschichteten Vertiefungen ("wells") fluoreszierendes 4-Methylumbelliferol nachzuweisen war, wenn die Enzymaktivität bei pH 5, dem katalytischen Optimum, bestimmt wurde (Tab.4).

Tabelle 4

Ausverdünnung von Fusionsproteinzellkulturüberstand (B73/2) auf CEA und GIT Mucin			
Verdünnungsstufen	Substrat in unterschiedlichen Lösungen		
	0.2 M Natriumacetatpuffer + 0.01 % BSA, pH 5, auf CEA	PBS, pH 7.2 auf CEA	PBS, pH 7.2 auf GIT Mucin
konzentriert	9118	2725	115,7
1:2	7678	2141	93,37
1:4	4662	1195	73,39
1:8	2927	618,5	60,68
1:16	1657	332,1	53,69
1:32	853	168,2	40,44
1:64	425	99,26	48,21
1:128	192,5	57,89	47,48

Eine Bestimmung der Umsatzrate bei pH 7.2 ergab, daß das Fusionsprotein bei diesem physiologischen pH noch  $\approx$  25 % der Umsatzrate bei pH 5 zeigte. Auf den mit GIT-Mucin gecoateten und bei pH 5 vermessenen Negativkontrollplatten konnte keine signifikante Methylumbelliferolfreisetzung gemessen werden.

Dieser Befund zeigt, daß die humanisierte V-Region des 431/26hum  $V_{Hhu}\beta$ Glc 1H Fusionsproteins ihre Epitopspezifität behalten hat und der  $\beta$ -Glucuronidaseanteil des Fusionsproteins in der Lage ist, ähnlich wie das menschliche native Enzym, das  $\beta$ -Glucuronid des 4-Methylumbelliferols zu spalten.

#### Beispiel K:

#### Nachweis der funktionellen Identität der V-Region des 431/26hum $V_{Hhu}\beta$ Glc 1H Fusionsproteins mit der des humanisierten MAK BW 431/26 und der des murinen MAK BW 431/26

Im Beispiel J wurde gezeigt, daß das 431/26hum  $V_{Hhu}\beta$ Glc 1H Fusionsprotein ein gewisses CEA-Bindungspotential sowie  $\beta$ -Glucuronidaseaktivität besitzt. Der im folgenden beschriebene antigenspezifische Kompetitionstest macht eine Aussage über die Identität der CEA-Epitope, die von den kompetitierenden

Molekülen erkannt werden sowie über die Interaktionsstärke der Epitop-Fusionsprotein- bzw. Epitop-Antikörper-Reaktion.

Dieser Test wird wie im folgenden beschrieben durchgeführt:

- Polystyrol 96 well Mikrotitrationsplatten (U-Form, Typ B, Fa. Nunc, gest.-Nr.: 4-60445) werden mit gereinigtem CEA (1-5 µg CEA/ml, hiervon 75 µl/well) oder mit GIT-Mucin (gleiche Menge wie CEA) über Nacht bei R.T. inkubiert.
- Das nicht adsorbierte Antigen wird abgesaugt und 3x mit 0.05 M Tris-Citrat-Puffer, pH 7.4, gewaschen.
- Die Mikrotitrationsplatten werden über Nacht mit der Öffnung nach unten auf Zellstoff bei R.T. stehen gelassen.
- Die Mikrotitrationsplatten werden 30 Minuten bei R.T. mit 250 µl 1%iger Caseinlösung in PBS, pH 7.2 /well inkubiert (Blockierungslösung).
- 50 µl des MAK BW 431/26 in einer Konzentration von 5 ng/ml werden mit 50 µl 10fach konzentriertem Überstand des humanisierten MAK BW 431/26 bzw. des Fusionsproteins sowie serieller 2x-Verdünnungen gemischt.
- Von diesen Mischungen werden 50 µl Aliquots in die wells der mit CEA- bzw. GIT-Mucin gecoateten Mikrotitrationsplatten pipettiert.
- Die Mikrotitrationsplatten werden für 30 Minuten bei R.T. inkubiert.
- Anschließend werden die Platten 3x mit ELISA-Waschpuffer (Fa. Behringwerke AG, Best.-Nr. OSEW 96, 250 µl) gewaschen.
- Anschließend werden 50 µl eines 1:250 verdünnten Ziege anti Maus Ig Antikörpers, welcher mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (Southern Biotechnology Associates, Best.-Nr.: 1010-04), zugegeben.
- Nach 30 Minuten Inkubation bei R.T. und 3maligem Waschen wird die Substratreaktion wie folgt durchgeführt:
- 30 µl pro well NADP 0,1 mM zugeben (7,65 mg lösen in 100 ml 20 mM Tris; 0,1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 9.5); die Lösung kann bei -20° C mehrere Monate gelagert werden.
- 30 Minuten bei R.T. inkubieren.
- Während der Inkubation mit NADP das Verstärkersystem ansetzen: (5 ml pro Platte)
  - 2 Teile INT (2,5 mg/ml mit 30%igem Ethanol im Ultraschallbad lösen; immer frisch ansetzen)
  - + 1 Teil PBS, pH 7.2
  - + 1 Teil Diaphorase (1 mg/ml PBS, pH 7.2)
  - + 1 Teil ADH (0,5 mg/ml PBS, pH 7.2)
- 50 µl des Verstärkersystems zugeben
- bei gewünschter Reaktionsstärke die Reaktion mit 0,1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 µl pro well abstoppen
- bei 492 nm im TITERTEK<sup>R</sup> MULTISCAN messen (Blankwert = 50 µl NADP + 50 µl Verstärkerlösung + 100 µl 0,1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

NADP - Fa. Sigma, Best.-Nr. N-0505

INT - Fa. Sigma, Best.-Nr. I-8377

ADH - Fa. Sigma, Best.-Nr. A-3263

Diaphorase - Fa. Sigma, Best.-Nr. D-2381

In diesem antigenspezifischen Kompetitionstest bedeutet die Reduktion der Extinktion eine Kompetition der miteinander kompetitierenden Moleküle um das gleiche oder räumlich sehr nahe zusammenliegende Epitop.

- Die erhaltenen Inhibitionsdaten zeigen, daß sowohl das Fusionsprotein 431/26hum V<sub>H</sub>huβGlc 1H als auch der humanisierte MAK 431/26 die Bindung des murinen MAK BW 431/26 an sein CEA-Epitop blockieren. Eine Inhibition von 50 % wird bei einem 200molaren Überschuß der entsprechenden Kompetitoren erreicht. Hieraus ist zu folgern, daß die Avidität des Fusionsproteins zu dem CEA-Epitop vergleichbar ist mit der des humanisierten MAK 431/26. Desweiteren bindet das Fusionsprotein und der humanisierte MAK an das gleiche bzw. ein räumlich dem durch den murinen MAK BW 431/26 auf CEA definierten Epitop sehr nahe liegendes Epitop.

#### Beispiel L:

#### 55 Nachweis der Gewebespezifität des 431/26hum V<sub>H</sub>huβGlc 2H Fusionsproteins

In Beispiel J wurde unter anderem gezeigt, daß das 431/26hum V<sub>H</sub>huβGlc 1H Fusionsprotein an gereinigtes CEA binden kann.



In Beispiel K wurde gezeigt, daß die V-Region des Fusionsproteins in der Lage ist, mit der V-Region des murinen BW 431/26 um das gleiche oder ein sehr naheliegendes Epitop zu kompetitieren. Mit Hilfe des im folgenden beschriebenen indirekten für  $\beta$ -Glucuronidase spezifischen immunhistochemischen Tests kann die Feinspezifität des Fusionsproteins auf kryopräservierten Geweben ermittelt werden.

5 Der Test ist im folgenden beschrieben:

- 6  $\mu$ m dicke Gefrierschnitte werden auf Objektträger aufgezogen und mindestens 30 Minuten luftgetrocknet.
- Anschließend werden die Objektträger 10 Sekunden in -20° C kaltem Aceton fixiert.
- Die Objektträger werden 5 Minuten in Tris/NaCl-Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- 20-100  $\mu$ l Fusionsprotein enthaltender BHK-Zellüberstand wird (konzentriert oder verdünnt in Tris/BSA, pH 7.4) pro Schnitt aufgetragen und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei R.T. inkubiert.
- Die Objektträger werden 5 Minuten in Tris/NaCl-Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- Pro Schnitt werden 50  $\mu$ l Hybridomüberstand des murinen anti  $\beta$ -Glucuronidase MAK BW 2118/157 hinzugegeben und die Objektträger für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei R.T. inkubiert.
- Anschließend werden die Objektträger 5 Minuten in Tris/NaCl- Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- Es werden 20-100  $\mu$ l Brücken-AK (Kaninchen-anti Maus IgG 1:100 verd. in Human-Serum, pH 7.4) pro Schnitt aufgetragen und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei R.T. inkubiert.
- Anschließend werden die Objektträger 5 Minuten in Tris/NaCl-Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- Danach werden 20-100  $\mu$ l APAAP-Komplex (Maus-anti AP 1:100 verd. in Tris/BSA, pH 7.4) pro Schnitt aufgetragen und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei R.T. inkubiert.
- Anschließend werden die Objektträger 5 Minuten in Tris/NaCl- Waschpuffer, pH 7.4, mit 0,1 % BSA gewaschen.
- Das Substrat für die alkalische Phosphatase wird wie folgt angesetzt (100 ml Substratlösung, ausreichend für eine Glasküvette):

Lösung 1: 3,7 g NaCl  
2,7 g Tris/Base in 75 ml Aqua dest  
lösen  
+ 26,8 ml Propandiol-Puffer, pH 9.75,  
einstellen mit HCl  
+ 42,9 mg Levamisol => klare, farblose Lösung  
Lösung 2: 21,4 mg Natriumnitrit in 535 µl Aqua dest  
lösen  
=> klare, farblose Lösung  
Lösung 3: 53,5 mg Naphthol-AS-Biphosphat in 642 µl  
Dimethylformamid (DMF) lösen =>  
klare, gelbliche Lösung

- In Lösung 2 (Natriumnitrit) 368  $\mu$ l 5%ige Neufuchsin-Lsg. geben und 1 Minute (Stoppuhr) reagieren lassen, so daß sich eine klare, braune Lösung ergibt
- Lösung 2 (Natriumnitrit mit Neufuchsin) und Lösung 3 (Naphthol-AS-Biphosphat) in Lösung 1 (Tris/NaCl/Propandiol-Puffer) geben => klare, gelbliche Lösung
- pH 8.8 einstellen mit HCl => trübe, gelbliche Lösung
- Lösung filtrieren und auf die Objektträger geben und 15 Minuten auf einem Schüttler reagieren lassen => Lösung wird trüb.
- Objektträger 10 Minuten in Tris/NaCl-Puffer, pH 7.4, waschen
- Objektträger 10 Minuten in Aqua dest waschen
- Nach 2 Stunden Lufttrocknen werden die Objektträger in Kaiser's Glyzeringelatine bei 56° C eingedeckelt.

Die spezifische Bindung des Fusionsproteins wurde lichtmikroskopisch durch die Rotfärbung der Epitoppositiven Gewebeschnitte nachgewiesen. Vergleichende Untersuchungen mit dem murinen MAK BW 431/26, der mittels der indirekten APAAP-Technik nachgewiesen wurde (Cordell et al., J. Histochem. Cytochem. 32, 219, 1984), ergaben, daß die Gewebespezifität des Fusionsproteins mit der des murinen MAK BW 431/26 genau übereinstimmte, d.h., daß sowohl der Reaktionstyp im individuellen Präparat, wie auch die Anzahl der positiven und negativen Befunde aus einer Vielzahl verschiedener Karzinome und Normalgewebe identisch ist.

#### Beispiel M:

10

#### Reinigung des 431/26hum V<sub>H</sub>hu $\beta$ Glc 1H Fusionsproteins

Murine bzw. humanisierte MAK können mittels immunaffinitätschromatographischer Verfahren, die für den Fc-Teil dieser Moleküle selektiv sind, gereinigt werden. Da in dem 431/26hum V<sub>H</sub>hu $\beta$ Glc 1H Fusionsprotein kein Fc-Teil vorhanden ist, mußte eine alternative hochselektive immunaffinitätschromatographische Methode entwickelt werden. Neben der Selektivität dieser zu entwickelnden Methode müssen die Isolationsbedingungen sehr milde sein, um die im sauren wie auch alkalischen Bereich sehr labile  $\beta$ -Glucuronidase nicht zu schädigen.

Das Prinzip der Methode besteht in der Reinigung des Fusionsproteins aus Überständen transfizierter BHK-Zellen, mittels eines gegen die humanisierte V-Region gerichteten anti-idiotypischen MAK. Die Herstellung solcher MAK ist literaturbekannt (Walter et al., Behring Inst. Mitt., 82, 182-192, 1988). Dieser anti-idiotypische MAK kann sowohl murin wie auch humanisiert sein. Der MAK ist vorzugsweise auf einer festen Phase so immobilisiert, daß seine V-Region nicht geschädigt wurde. Beispiele hierzu sind literaturbekannt (Fleminger et al., Applied Biochem. Biotechnol., 23, 123-137, 1990; Horsfall et al., JIM 104, 43-49, 1987).

Der so auf der festen Phase nach bekannten Methoden immobilisierte anti-idiotypische MAK bindet das aus transfizierten BHK-Zellen zu reinigende Fusionsprotein sehr effizient, z.B. bei pH 7, hat aber die überraschende Eigenschaft, daß er das Fusionsprotein schon bei einer Absenkung des pH-Wertes um 2,5 Stufen, auf pH 5.5, nicht mehr bindet. Das Fusionsprotein wird durch diese milde pH-Elutionstechnik weder in seiner Fähigkeit, an CEA zu binden, noch in seiner enzymatischen Aktivität beeinträchtigt (Methodik siehe Beispiel J).

In Tab. 5 sind die OD Werte und fluorogenen Einheiten (FU) der einzelnen Fraktionen aus einer Reinigung mit Hilfe des Festphasen-immobilisierten, anti-idiotypischen MAK BW 2064/34 gezeigt.

35

40

45

50

55

Tabelle 5

Anti-idiotyp Affinitätschromatographie					
5	Fraktionen	OD in % FU in % pH-wert Chromatografieverlauf			
	1-5	1	0	7.2	Vorspülen der Säule mit PBS, pH 7.2
	6-142	20	0	7.2	Probenauftrag
	143-162	1	0	7.2	Spülen der Säule mit PBS, pH 7.2
10	163	1	0	7.2	Elution mit PBS, pH 4.2
	164	1	0	7.2	
	165	1	0	7.2	
	166	1	0	6.8	
	167	2	10	6.1	
15	168	5	20	5.7	
	169	16	40	5.6	
	170	23	80	5.5	
	171	26	100	5.4	
	172	24	80	5.3	
20	173	19	60	5.2	
	174	14	40	5.2	
	175	10	30	5.1	
	176	8	25	5.1	
	177	6	20	5.1	
25	178	3	10	5.0	
	179	2	5	5.0	
	180	1	0	5.0	
1 Fraktion = 6.6 min sammeln (bei 18 ml/h Pumpengeschwindigkeit) = 2 ml Die FU-Werte sind in % des höchsten Wertes (Fraktion 171) angegeben.					
30					

Mittels der OD Messung bei 280 nm wurde die Elution des Fusionsproteins als Protein gemessen. Zusätzlich wurden die isolierten Fraktionen auf spezifische Bindung an CEA und gleichzeitige Enzymaktivität im Spezifitätsenzymaktivitätstest überprüft (Beispiel J). Die Werte zeigen, daß die gesamte spezifische Bindungs- und Enzymaktivität in einem Peak (um pH 5.0 bis pH 5.6 Elutionspeak) konzentriert war. Hieraus ist zu folgern, daß die so beschriebene Methode der Antiidiotyp-Affinitätschromatographie eine sehr effiziente und selektive Reinigungstechnik für das 431/26hum V<sub>H</sub>huβGlc 1H Fusionsprotein darstellt.

#### Beispiel N:

#### Gelchromatographie der Fusionsproteine

Die Überstände von den das 431/26hum V<sub>H</sub> huβGlc 1H Fusionsprotein sekretierenden BHK Zellen (B 70/6, B 74/2, B 72/72, B 73/2) wurden abgenommen, sterilfiltriert und einer analytischen Gelfiltration unterworfen. Dazu wurde eine TSK G3000 SW-XL Säule (7.8 x 300 mm) mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 6.7, + 0.02 % NaN<sub>3</sub> equilibriert, 20 µl des Überstandes aufgetragen und mit einer Flußrate von 0.6 ml/min eluiert. Beginnend mit einer Elutionszeit von 9 min (Ausschlußvolumen 9.5 min) wurden Fraktionen (je 0.3 min) gesammelt und auf β-Glucuronidaseaktivität getestet.

Dazu wurden 25 µl aus der jeweiligen Fraktion mit 75 µl Substratlösung (2.5 mM 4-Methylumbelliferyl-β-glucuronid in 200 mM Na-Acetatpuffer, pH 5, + 0.1 mg/ml BSA) gemischt und bei 37° C 2 Stunden inkubiert. Dann wurde mit 1.5 ml 0.2 M Glycin/0.2 % SDS-Lösung, pH 11.7, abgestoppt und der von der Glucuronidase freigesetzte fluoreszierende Label mit einem Hitachi Fluorometer (bei 360 nM Anregungswellenlänge, 450 nM Emissionswellenlänge) quantifiziert.

#### Ergebnis:

Alle 4 Konstrukte zeigen einen einzigen Hauptaktivitätspeak zwischen Fraktionen 4 und 6 (Tabelle 6).

Das entspricht Retentionszeiten von ca. 10.2 - 10.8 min. Die in den Überständen vorliegenden Glucuronida-seaktiven Fusionsproteine haben somit Retentionszeiten, die in der gleichen Größenordnung wie die von chemisch hergestellten Antikörper- $\beta$ -Glucuronidasekonstrukten (10.4 min) liegen. Die Retentionszeit für das freie Enzym liegen bei 11.9, für den freien Antikörper bei 12.3 min.

5

Tabelle 6:**Gelfiltration unterschiedlicher Fusionsproteine**

10

Inkubation: 25  $\mu$ l, 37° C, 120 min

Substanzkonzentration: 1.875 mM; 0.1 mg/ml BSA

Fraktion je 0.3 min; Start bei 9 min

15

freigesetzter Label/Assay (FU)

Fraktionen	B70/6	B74/2	B72/72	B73/2
------------	-------	-------	--------	-------

20

1	11	17	15	15
2	22	35	44	38
3	125	97	873	1014
4	1072	196	2959	3994
5	1588	165	2206	3141
6	1532	120	1133	1760
7	941	103	581	926
8	710	69	376	723
9	500	108	302	626
10	371	123	316	613
11	320	107	263	472
12	254	91	210	456
13	224	57	146	357
14	190	65	134	332
15	171	52	83	294
16	167	44	99	243
17	100	38	73	217
18	129	34	55	179
19	75	45	48	155
20	66	41	36	129
21				118
22				93
23				78
24				61
25				24
26				51

30

35

40

45

50

55

Beispiel O:

### Molekulare Charakterisierung des 431/26 hum V<sub>H</sub> hu $\beta$ Glc1H Fusionsproteins

In Beispiel M wurden die Fusionsproteine mittels Antiidiotyp-Affinitätschromatographie gereinigt. Aliquots aus dem Elutionspeak von pH 5.5 wurden in der 10 % SDS-PAGE unter nicht reduzierenden bzw. 5 reduzierenden Bedingungen elektrophoriert und im Westernblot mit Hilfe antiidiotypischer MAK bzw. mit anti  $\beta$ -Glucuronidase MAK immungefärbt (Towbin and Gordon (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354).

Unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte beim 431/26 hum V<sub>H</sub> hu $\beta$ Glc1H Fusionsprotein eine Hauptbande von  $\approx$  125 kDa und eine Bande von 250 kDa nachgewiesen werden, die sowohl von anti-idiotypischen MAK als auch von anti  $\beta$ -Glucuronidase MAK im Western Blot nachweisbar waren. Unter 10 reduzierenden Bedingungen war weder durch die anti-idiotypischen noch durch die anti $\beta$ -Glucuronidase MAK eine Immunfärbung erkennbar. In der reduzierenden SDS-PAGE konnte eine 100 kDa und eine 25 kDa Bande nachgewiesen werden. Diese unter denaturierenden Bedingungen analysierten Moleküle liegen allerdings unter nativen Bedingungen nach TSK G 3000 SW-XL Gelfiltration als ein höher molekulares 15 Produkt vor, welches ein Molekulargewicht von  $\approx$  250 kDa hat (Beispiel N). In Fig. M sind schematische Darstellungen des 431/26 hum V<sub>H</sub> hu $\beta$ Glc1H Fusionsproteins gezeigt. Die Figur Mb zeigt das Monomer, welches eine  $\approx$  25 kDa leichte Kette und eine  $\approx$  100 kDa schwere Kette besitzt. Dieses Monomer und ein über "inter heavy chain" Disulfidbrücken verknüpftes Dimer läßt sich unter denaturierenden Bedingungen nachweisen (Fig. Ma). Unter nativen Bedingungen liegt das Fusionsprotein als Dimer von  $\approx$  250 kDa vor, mit 20 bzw. ohne "inter heavy chain" Disulfidbrücken (Fig. Mc).

#### BEISPIEL P:

#### Chemische Modifizierung des Fusionsproteins

Das nach Beispiel N gereinigte Fusionsprotein (110  $\mu$ g/ml) wurde auf pH 4.5 eingestellt und mit Natriumperiodat versetzt (Endkonzentration 1 mM). Nach 1stündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen wurde das Natriumperiodat mittels Gelchromatographie entfernt und das Fusionsprotein dann auf pH 8 umgestellt. Nach Zugabe von Ethanolamin bis zu einer Endkonzentration von 0.1 M wurde weitere 3 30 Stunden bei 4° C inkubiert, dann Natriumcyanoborhydrid (Endkonzentration 5 mM) dazugegeben und 30 min inkubiert (Reduktion). Daran schloß sich wieder eine Gelfiltration zur Entfernung des Reduktionsmittels und zur Umpufferung des Fusionsproteins an. Die chemische Modifikation hatte keine Auswirkung auf die funktionelle Aktivität des Fusionsproteins. Tab. 7 zeigt einen Verlauf der Plasmakonzentrationen von unmodifiziertem und modifiziertem Fusionsprotein in der Nacktmaus. Die Eliminierung des Fusionsproteins 35 aus dem Plasma ist durch die Modifizierung stark verlangsamt.

Tabelle 7

Plasmaspiegel der $\beta$ -Glucuronidaseaktivität in der Nacktmaus		
t [min]	$\beta$ -Glucuronidase-Fusionsprotein	
	behandelt % Aktivität	unbehandelt % Aktivität
0	100	100
10		54
30	76	
60		22
240	40	4
480		1
1380	19	
1440		1
5880	3	

#### BEISPIEL Q:

#### Enzymatische Behandlung des Fusionsproteins

53 µg Fusionsprotein (Beispiel N) in 0.01 M Tris/HCl, 0.15 M NaCl wurden mit 1 Unit löslicher alkalischer Phosphatase (E. coli) bzw. immobilisierter alkalischer Phosphatase (bovine intestine) 20 h bei Raumtemperatur inkubiert. Tab. 8 zeigt den Verlauf der Plasmakonzentration von unbehandeltem und behandeltem Fusionsprotein in der Nacktmaus. Die Eliminierung wird durch die Enzymbehandlung nicht signifikant beeinflusst.

Tabelle 8

Plasmaspiegel der $\beta$ -Glucuronidaseaktivität in der Nacktmaus			
t [min]	$\beta$ -Glucuronidase Fusionsprotein		
	unbehandelt [%]	AP (Rinderdarm,immobil.) behandelt [%]	AP (E. coli) behandelt [%]
0	100	100	100
10	78	76	65
30	44	57	53
60	35	36	35
240	22	27	22
1440	4	5	5
AP = alkalische Phosphatase			

**Beispiel R:****Pharmakokinetik und Tumorretention des 431/26 hum  $V_H$  hu $\beta$ Glc 1H Fusionsproteins**

Beispielhaft wurden 5x 4 µg gereinigtes und mit 100 µg HSA/ml vermischtes Fusionsprotein in unmodifizierter (Beispiel N) bzw. chemisch modifizierter Form (Beispiel P) i.v. in 24stündigen Abständen in CEA exprimierende humane Tumor-tragende Nacktmäuse injiziert. Nach definierten Zeiträumen wurden je 3 Tiere durch Genickbruch getötet. Die Organe wurden entnommen, gewogen und mit 2 ml 1%igem BSA in PBS, pH 7.2, versetzt. Anschliessend wurden die Gewebe und Zellen aus diesen Organen durch pottern zerstört (10 Stöße) und die Menge an funktionell aktivem Fusionsprotein nach Zentrifugation der Suspension bei 3000 rpm und RT für 10' (Heraeus Labofuge GL, Typ 2202) im Spezifitätsenzym-Aktivitätstest (siehe Beispiel J) in Überstand bestimmt. Die Daten aus einem repräsentativen Experiment sind in Tab. 9 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß sich das chemisch modifizierte Fusionsprotein, welches eine  $t_{1/2\beta}$  von  $\approx 4$  h hat, spezifisch ab  $\geq 3$  Tagen nach Beendigung der repetitiven Injektionsphase im Tumor anreichert. Das unmodifizierte Fusionsprotein, welches eine  $t_{1/2\beta}$  von  $\approx 20$  min besitzt, zeigte unter den gleichen experimentellen Bedingungen keine signifikante Tumoranreicherung.

Aus diesen Daten darf gefolgert werden, daß das hu 431  $\beta$ -Glc Fusionsprotein in der Lage ist, in vivo an CEA-positive Tumore zu binden und dort als enzymatisch aktives Molekül über lange Zeiträume ( $> 9$  Tage) zu verweilen. Der Zeitpunkt für die Anwendung der Prodrug sollte in diesem System zwischen Tag 3 und 9 nach Beendigung der Fusionsproteininjektion liegen.

Tabelle 9:

Tumorretentionsexperiment mit CEA-positivem humanem Magenkarzinom Xenograft (Mz Sto 1)

i.v. Injektion von 5 x 4 µg Fusionsprotein pro Maus in 24-Stundenintervallen

Zeit (Std.) nach letzter i.v. Injektion	% Aktivität/g Tumor oder Organ				
	Tumor	Leber	Lunge	Milz	Niere Eingeweide Plasma
3	100	100	100	100	100
24	86.7	49.3	26.3	-	64 123 44.4
72	26.4	11	4.4	-	8.1 19 6.5
216	24.4	1.5	0.13	1.2	0.4 0.5 0.015

55 **Beispiel S:**

Isoelektrische Fokussierung des 431/26 hum V<sub>H</sub> hu βGlc 1H Fusionsproteins

Das mittels Anti-idiotyp Affinitätschromatographie gereinigte Fusionsprotein (Beispiel N) wurde im "Pharmacia Fast System" isoelektrisch entsprechend der Methode von Righetti et al. (1979) fokussiert. Hierbei zeigte sich, daß der isoelektrische Punkt des Moleküls in einem pH-Bereich von 7.35 bis 8.15 liegt.

## 5 BEISPIEL T:

### Nachweis der Spaltbarkeit einer Zytostatika-Prodrug durch 431/26 hum V<sub>H</sub> hu $\beta$ Glc 1H Fusionsprotein

Im Beispiel J wurde gezeigt, daß der  $\beta$ -Glucuronidaseanteil des Fusionsproteins, ähnlich wie das menschliche native Enzym, in der Lage ist, das  $\beta$ -Glucuronid des 4-Methylumbelliferol zu spalten. In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurde als Substrat für die enzymatische Spaltung ein über eine Spacergruppe verknüpft  $\beta$ -Glucuronid des Zytostatikums Daunomycin eingesetzt. Im einzelnen wurden diese Untersuchungen wie folgt durchgeführt:

4 mg der in der französischen Patentanmeldung (No. d'Enregistrement National: 9105326) beschriebenen Verbindung N-(4-hydroxy-3-nitro-benzyloxycarbonyl)-daunorubicin- $\beta$ -D-glucuronid (Prodrug) wurden in 1 ml 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7.2, gelöst. Zu jeweils 5  $\mu$ l dieser Substratlösung wurden 35  $\mu$ l des Fusionsproteins (Beispiel N) bzw. der humanen  $\beta$ -Glucuronidase (Gesamtkonzentration jeweils 6.5 U/ml; 1 U = Spaltung von 1  $\mu$ Mol 4-Methylumbelliferol/min bei 37° C) hinzupipettiert und bei 37° C im Dunkeln inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben (5  $\mu$ l) des Inkubationsansatzes entnommen und direkt mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie unter folgenden Bedingungen analysiert:

Säule:

Nucleosil 100 RP 18, 5  $\mu$ m Teilchendurchmesser, 125 x 4.6 mm

Mobile Phase:

Gradient aus Lösung A (100 % Acetonitril) und Lösung B (20 mM Phosphat-Puffer pH 3.0)

0 min: 30 % Lösung A

15 min: 70 % Lösung A

20 min: 70 % Lösung A

Flußrate: 1 ml/min

Detektion: Fluoreszenz, Excitation 495 nm, Emission 560 nm

Datenauswertung: Beckman System Gold Software

Die Retentionszeit der Ausgangsverbindung (Prodrug) betrug unter diesen Chromatographiebedingungen 11 min. Die während der Inkubation entstehende Verbindung (Drug) wies eine mit Daunomycin (DNM, Analyse eines Standards unter gleichen Bedingungen) identische Retentionszeit von 8.9 min auf. Die Kinetik der Spaltung der Ausgangsverbindung durch das Fusionsprotein bzw. humane  $\beta$ -Glucuronidase sind in Tab. 11 bzw. Tab. 10 dargestellt.

Die Halbwertszeit der Spaltung der Prodrug durch das Fusionsprotein betrug 2.3 h. Die Spaltung durch humane  $\beta$ -Glucuronidase erfolgte mit einer Halbwertszeit von 0.8 h. Wie bereits im Beispiel J dargestellt zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen, daß der  $\beta$ -Glucuronidaseanteil des Fusionsproteins funktionell aktiv und in der Lage ist,  $\beta$ -Glucuronide zu spalten. Die Kinetik der Abspaltung des Glucuronidanteiles bzw. die Freisetzung der Drug (Daunomycin) aus der verwendeten Prodrug erfolgt mit einer zu humaner  $\beta$ -Glucuronidase größenordnungsmäßig vergleichbaren Geschwindigkeit, so daß die Substratspezifität des Fusionsproteins im wesentlichen mit der von humaner  $\beta$ -Glucuronidase übereinstimmt.

Tabelle 10

Kinetik der Prodrugspaltung durch $\beta$ -Glucuronidase (human, rekombinant)		
t min	prodrug area %	DNM area %
0	99.2	0.8
57	36.0	64.0
130	10.3	89.7
227	9.3	90.7



Tabelle 11

5	Kinetik der Prodrugspaltung durch $\beta$ -Glucuronidase (Fusionsprotein)		
	t min	prodrug area %	DNM area %
	0	98.9	1.1
	50	81.1	18.9
	135	51.7	48.3
10	190	33.0	67.0
	247	22.0	78.0
	317	12.4	87.6

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Sequenzprotokoll

Seq. ID No.: 1  
 5 Art der Sequenz: Nukleotid mit entsprechendem Protein  
 Sequenzlänge: 354  
 Strangform: Einzelstrang  
 Topologie: linear  
 Art des Moleküls: cDNA  
 10 Organismus: Mensch  
 Name der Zelllinie: Hybridom 431/26  
 Eigenschaften: V<sub>H</sub> Immunglobulinen

15

20

## Tab.3

431/26 VH hum

25

30

35

40

45

50

55

10	30	50
caactgcaggagagcggtccaggtctt	gtgagacctagccagaccctgagcctgacctgc	
GlnLeuGlnGluSerGlyProGlyLeuValArgProSerGlnThrLeuSerLeuThrCys		
70	90	110
accgtgtctggcttcaccatcagcagtggttatagctggcactgggtgagacagccacct		
ThrValSerGlyPheThrIleSerSerGlyTyrSerTrpHisTrpValArgGlnProPro		
130	150	170
ggacgaggtcttgagtggattggatacatacagtacagtggtatcactaactacaacccc		
GlyArgGlyLeuGluTrpIleGlyTyrIleGlnTyrSerGlyIleThrAsnTyrAsnPro		
190	210	230
tctctcaaaagtagagtgacaatgctggtagacaccagcaagaaccagttcagcctgaga		
SerLeuLysSerArgValThrMetLeuValAspThrSerLysAsnGlnPheSerLeuArg		
250	270	290
ctcagcagcgtgacagccgccgacaccgcggtctattattgtgcaagagaagactatgat		
LeuSerSerValThrAlaAlaAspThrAlaValTyrTyrCysAlaArgGluAspTyrAsp		
310	330	350
taccactgggtacttcgatgtctggggtcaaggcagcctcgtcacagtctcctca		
TyrHisTrpTyrPheAspValTrpGlyGlnGlySerLeuValThrValSerSer		

**ggtgtccactccgacatccagatgaccagagccaagcagcctgagcgccagcgtgggt**  
GlyValHisSerAspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaSerValGly  
**70                    90                    110**

**gacagagtgacctcacctgtagtaccagctcgagtgttaagttacatgcactgggtaccag**  
AspArgValThrIleThrCysSerThrSerSerSerValSerTyrMetHisTrpTyrGln  
**130                150                170**

**cagaagccaggtaaaggctccaaagctgctgatctacagcacatccaacctggcttcttggt**  
GlnLysProGlyLysAlaProLysLeuLeuIleTyrSerThrSerAsnLeuAlaSerGly  
**190                210                230**

**gtgcccaagcagattcagcggtagcggtagcggtagccgacttcaccttcaccatcagcagc**  
ValProSerArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThrPheThrIleSerSer  
**250                270                290**

**ctccagccagaggacatcgccacctactactgccatcagtgaggtagttatcccacgttc**  
LeuGlnProGluAspIleAlaThrTyrTyrCysHisGlnTrpSerSerTyrProThrPhe  
**310                330**

**ggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgt**  
GlyGlnGlyThrLysValGluIleLysArg

1. Fusionsproteine zur Prodrug-Aktivierung der Formel huTuMAK-L- $\beta$ -Gluc, wobei huTuMAK einen humanisierten tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein tumorbindendes Fragment davon bedeutet, L für einen Linker steht und  $\beta$ -Gluc human  $\beta$ -Glucuronidase ist.
2. Fusionsproteine nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V<sub>H</sub>-Exon, einem CH<sub>1</sub>-Exon und einem Hinge-Exon besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, welche nicht durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.
3. Fusionsproteine nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V<sub>H</sub>-Exon, einem CH<sub>1</sub>-Exon und zwei Hinge-Exons besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, bei welchem die schwere Ketten Fragmente durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.
4. Fusionsproteine nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V<sub>H</sub>-Exon, einem CH<sub>1</sub>-

Exon und drei Hinge-Exons besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

- 5 5. Fusionsproteine nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V<sub>H</sub>-Exon, einem CH<sub>3</sub>-Exon besteht und bei Expression zusammen mit einer modifizierten leichten Kette aus V<sub>L</sub> und CH<sub>3</sub> Domäne assoziieren kann.
6. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der huTuMAK-Anteil aus MAK BW 431/36 stammt.
- 10 7. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der huTuMAK-Anteil aus einer der in EP-A1-0 388 914 beschriebenen MAK gebildet wird.
8. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 7, in dem L einen Polypeptidspacer nach Tab. 1 und/oder 2 enthält.
- 15 9. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 8, in dem L 1, 2 oder 3 Hinge-Regionen eines humanen IgG3 C-Gens enthält.
- 20 10. Plasmide, die die cDNA für Peptide nach Anspruch 1 bis Anspruch 9 enthalten.
11. Transformierte eukaryotische Zellen, die mit Plasmiden nach Anspruch 10 transformiert sind.
12. Verfahren zur Herstellung von Proteinen nach Anspruch 1 bis Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß in transformierten Zellen mittels Plasmiden diese Fusionsproteine exprimiert werden und die Isolierung besagter Fusionsproteine über antiidiotypische MAK erfolgt.
- 25 13. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine mit einem Oxidationsmittel behandelt werden.
- 30 14. Fusionsproteine nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß in einem zweiten Reaktionsschritt die Fusionsproteine reduktiv aminiert werden.
15. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 mit einem Oxidationsmittel behandelt werden.
- 35 16. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in einem ersten Reaktionsschritt oxidiert werden und in einem zweiten Reaktionsschritt reduktiv aminiert werden.
- 40 17. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und Ansprüche 13 und 14 als Arzneimittel.
18. Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und Ansprüche 13 und 14 als Diagnostikum.

45 **Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten : GR, ES**

- 50 1. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen zur Prodrug-Aktivierung der Formel huTuMAK-L- $\beta$ -Gluc, wobei huTuMAK einen humanisierten tumorspezifischen monoklonalen Antikörper oder ein tumorbindendes Fragment davon bedeutet, welcher über einen Linker L mit humaner  $\beta$ -Glucuronidase  $\beta$ -Gluc verbunden wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V<sub>H</sub>-Exon, einem CH<sub>1</sub>-Exon und einem Hinge-Exon besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, welche nicht durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.
- 55 3. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V<sub>H</sub>-Exon, einem CH<sub>1</sub>-Exon und zwei Hinge-Exons besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, bei welchem die schwere Ketten Fragmente durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

4. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V<sub>H</sub>-Exon, einem CH<sub>1</sub>-Exon und drei Hinge-Exons besteht und zur Expression von Fusionsproteinen führt, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.
5. Verfahren nach Anspruch 1, in dem das Antikörperfragment aus einem V<sub>H</sub>-Exon, einem CH<sub>3</sub>-Exon besteht und bei Expression zusammen mit einer modifizierten leichten Kette aus V<sub>L</sub> und CH<sub>3</sub> Domäne assoziieren kann.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der huTuMAK-Anteil aus MAK BW 431/36 stammt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der huTuMAK-Anteil aus einer der in EP-A1-0 388 914 beschriebenen MAK gebildet wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, in dem L einen Polypeptidspacer nach Tab. 1 und/oder 2 enthält.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, in dem L 1, 2 oder 3 Hinge-Regionen eines humanen IgG3 C-Gens enthält.
10. Verfahren zur Herstellung von Plasmiden, die für Peptide nach Anspruch 1 bis Anspruch 9 kodieren, dadurch gekennzeichnet, daß die cDNA für Peptide nach Anspruch 1 - 9 in die Plasmide kloniert wird.
11. Verfahren zur Herstellung von transformierten eukaryotischen Zellen, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit Plasmiden nach Anspruch 10 transformiert werden.
12. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach Anspruch 1 bis Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß in transformierten Zellen mittels Plasmiden diese Fusionsproteine exprimiert werden und die Isolierung besagter Fusionsproteine über antiidiotypische MAK erfolgt.
13. Verfahren zur Herstellung von Fusionsproteinen nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Fusionsproteine mit einem Oxidationsmittel behandelt werden.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß in einem zweiten Reaktionsschritt die Fusionsprotein reaktiv aminiert werden.
15. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, dadurch gekennzeichnet, daß Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und Ansprüche 13 und 14 verwendet werden.
16. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums, dadurch gekennzeichnet, daß Fusionsproteine nach einem der Ansprüche 1 bis 9 und Ansprüche 13 und 14 verwendet werden.

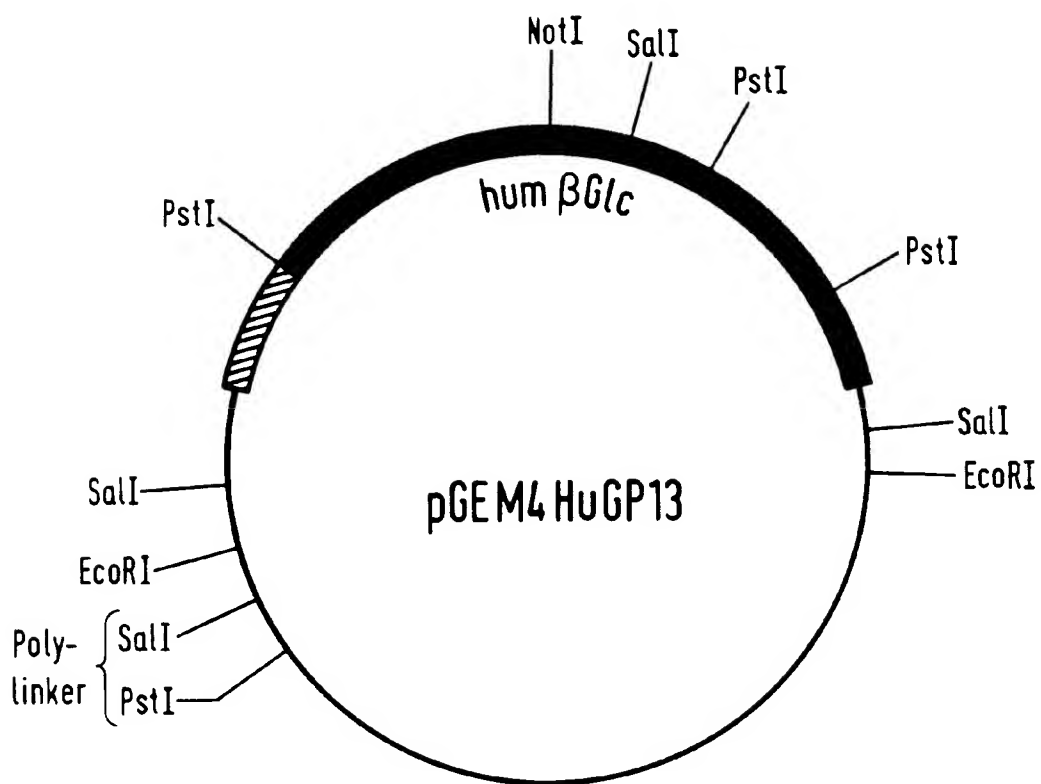


Fig. A

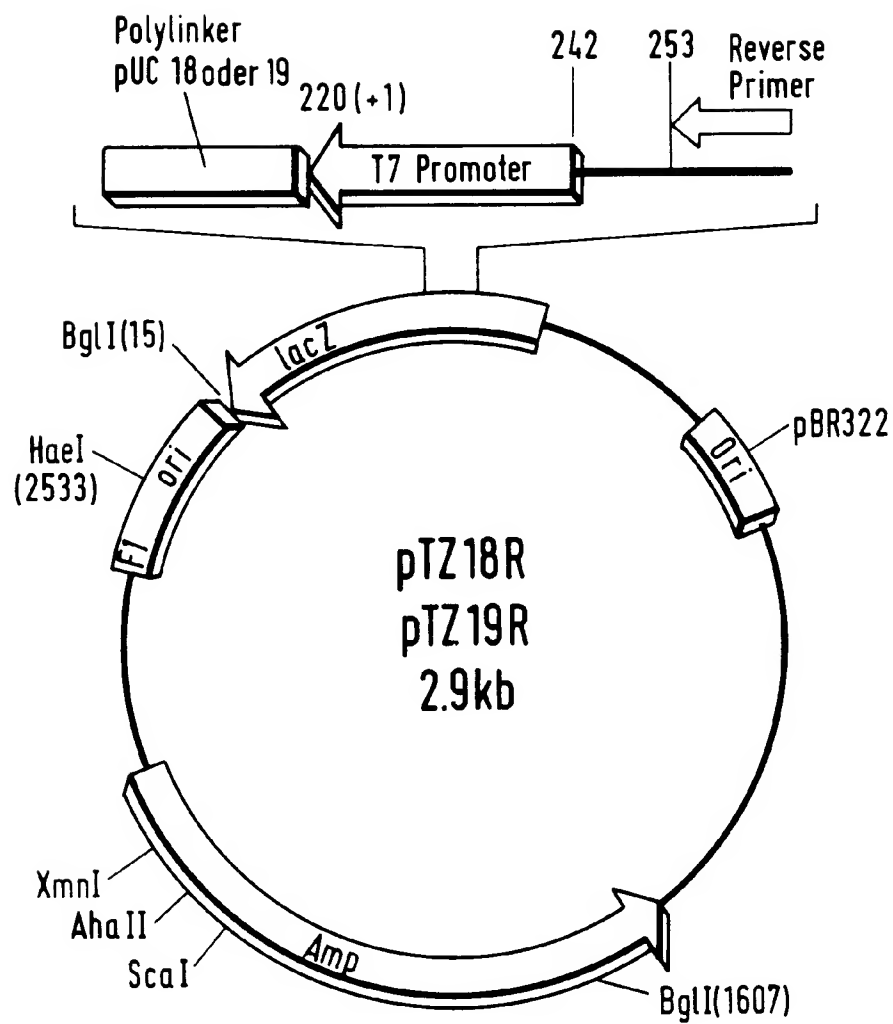


Fig. B.1

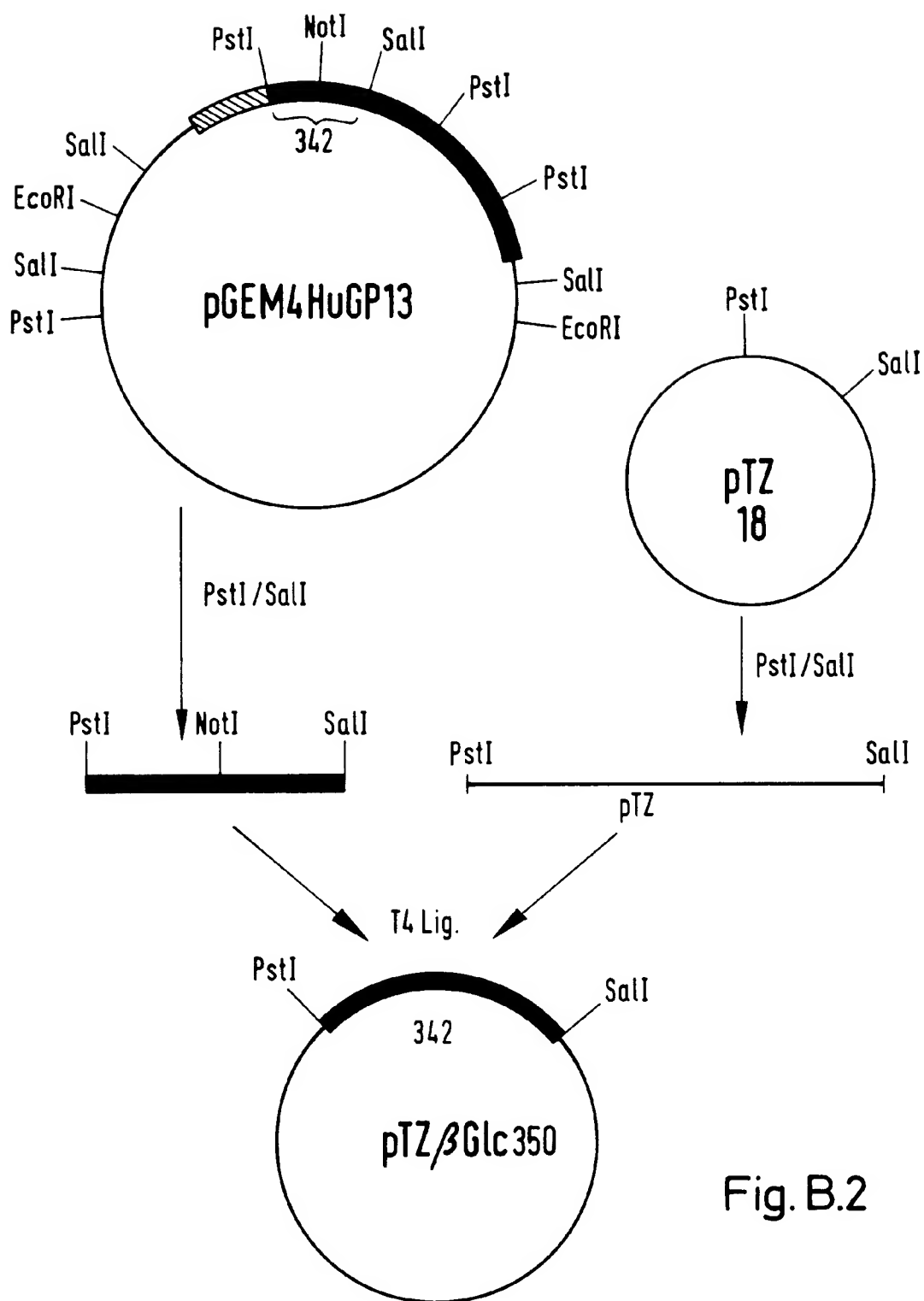
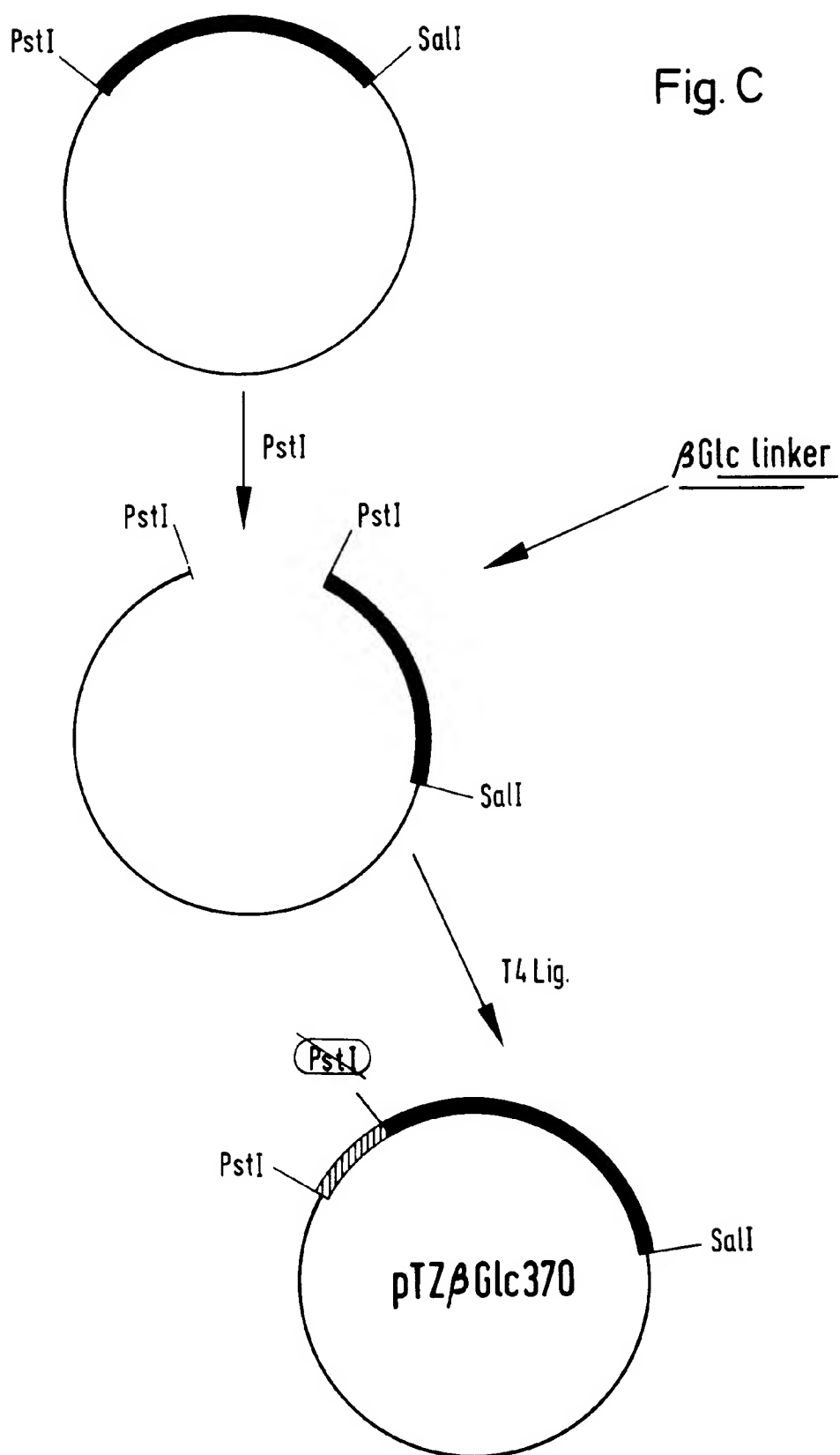


Fig. B.2



Fig. C



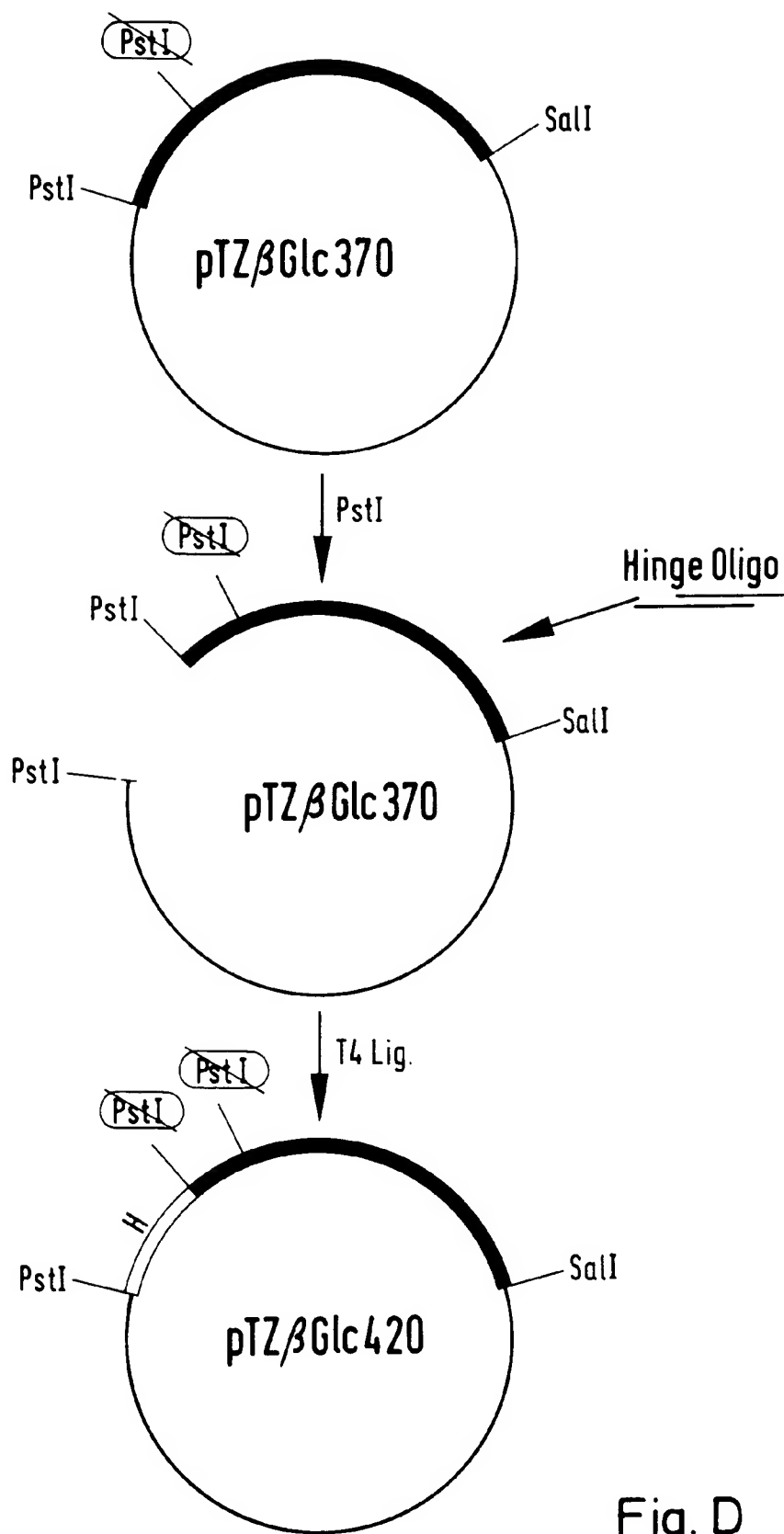


Fig. D

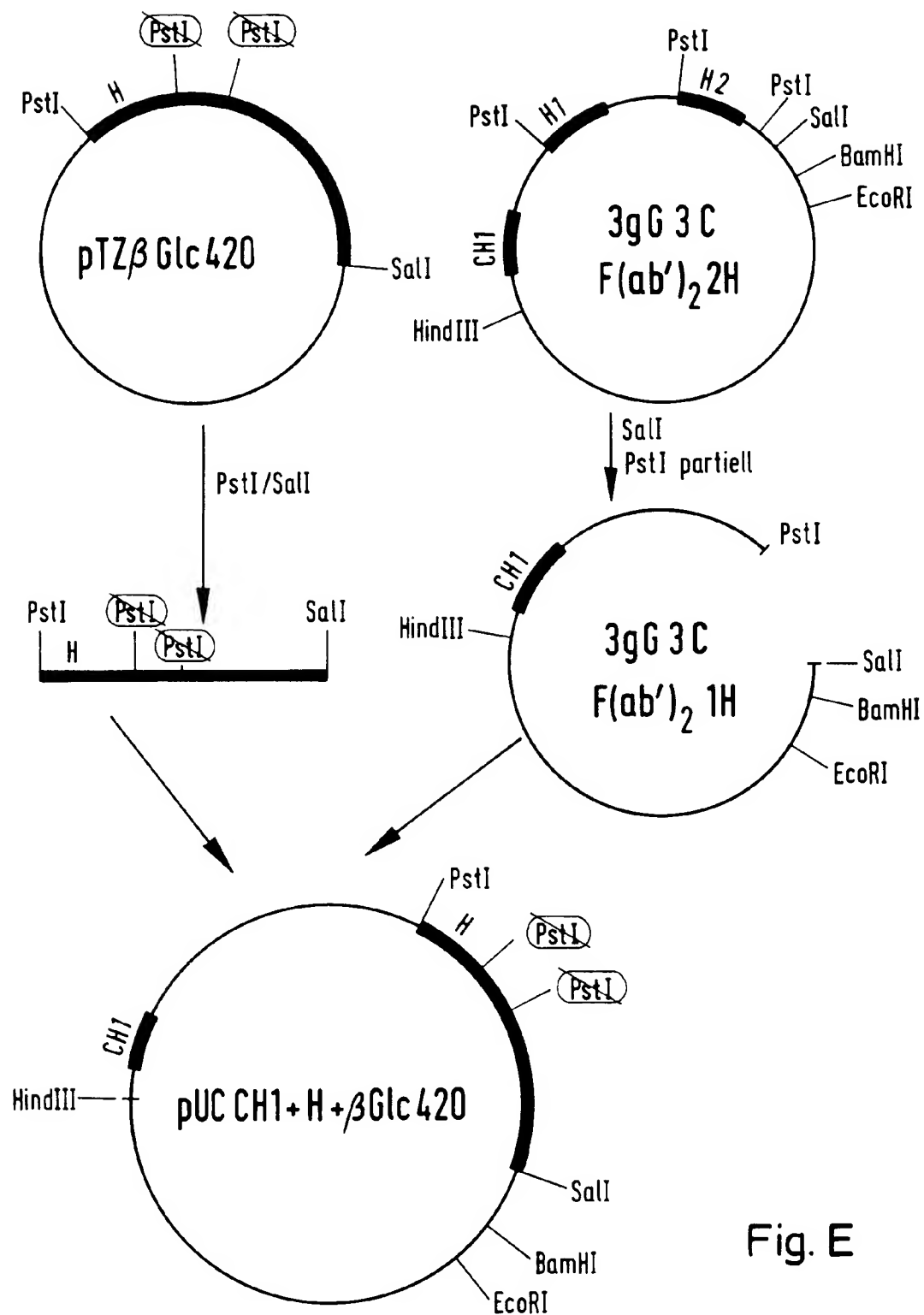


Fig. E

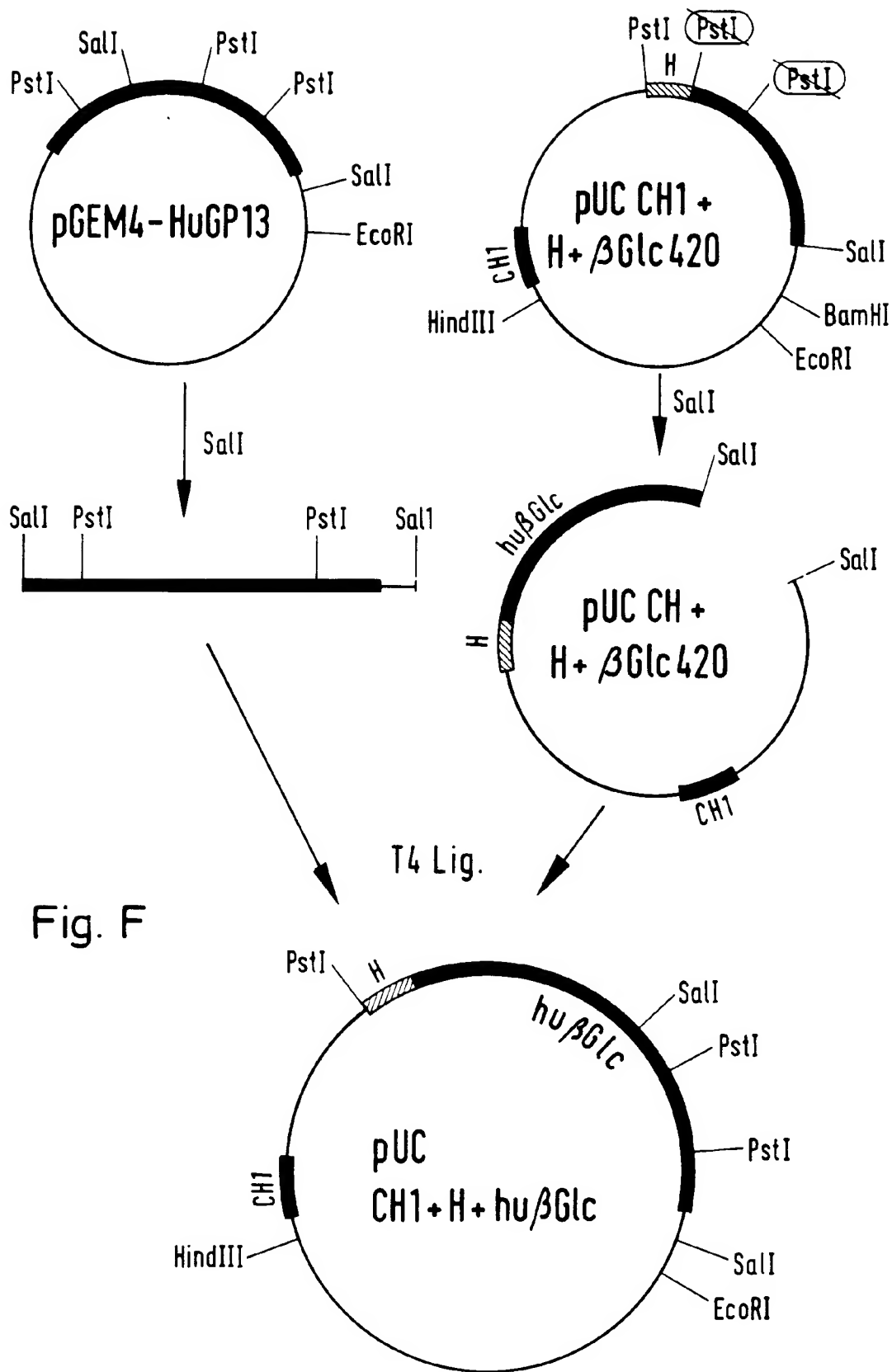


Fig. F

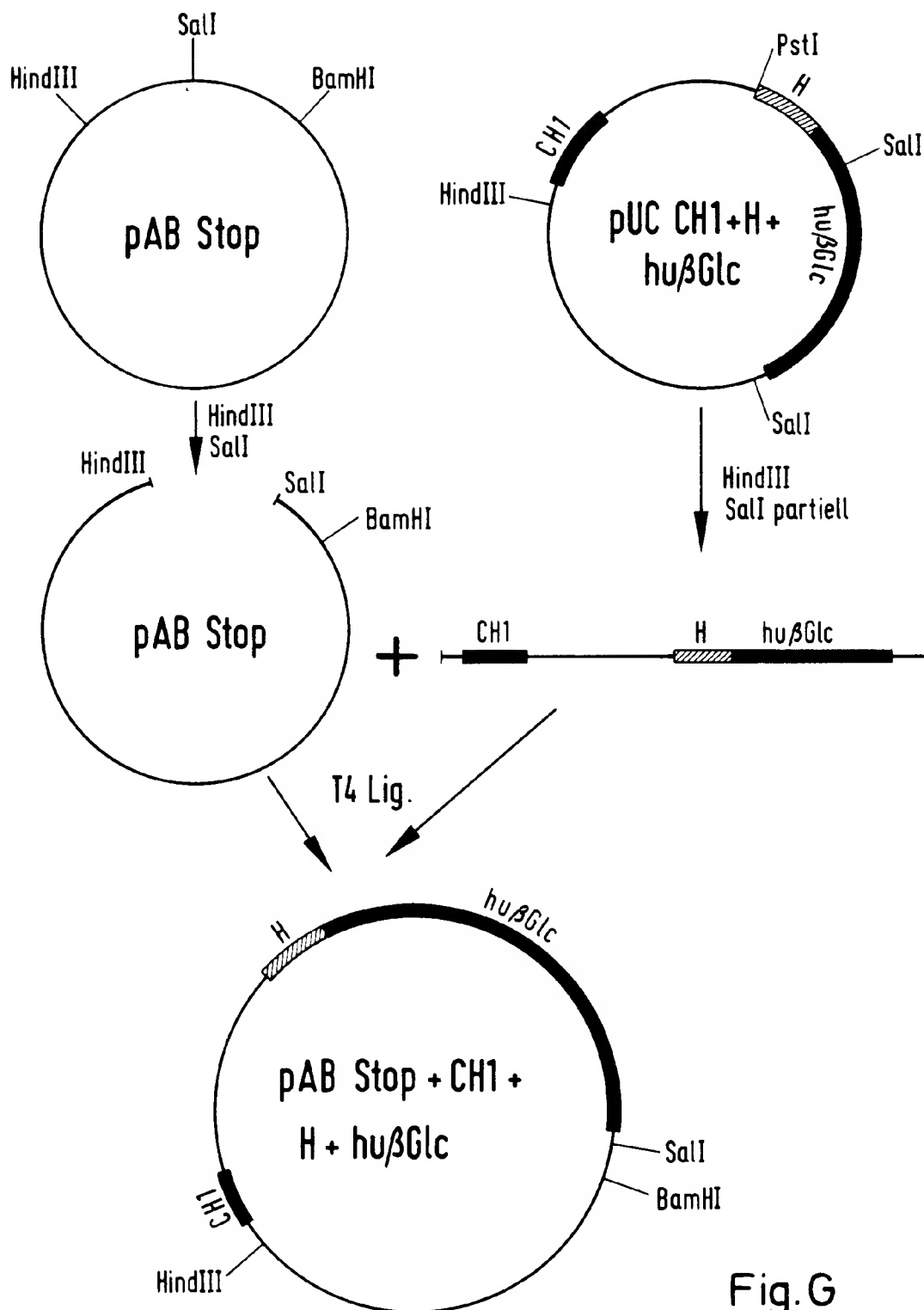


Fig.G

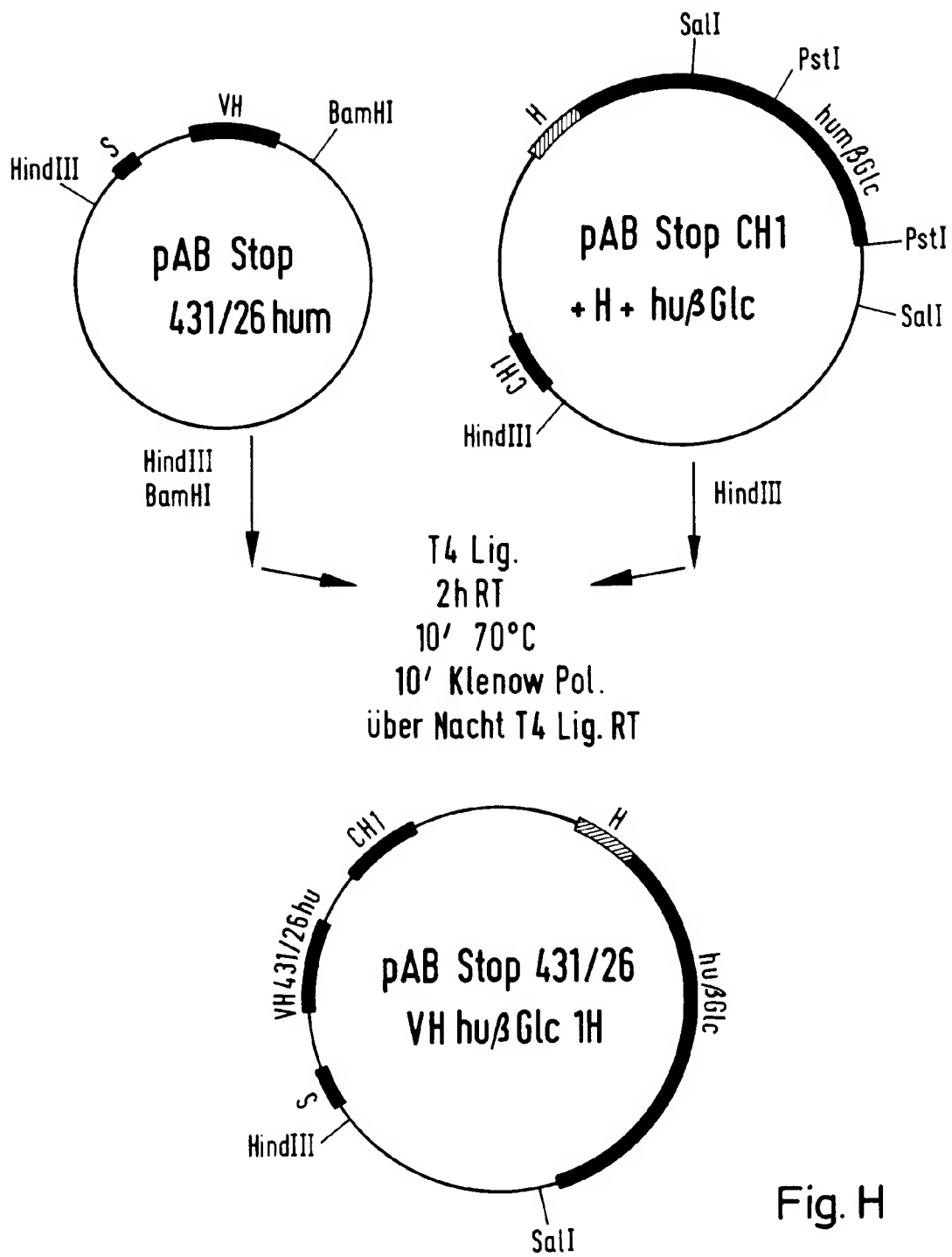


Fig. H

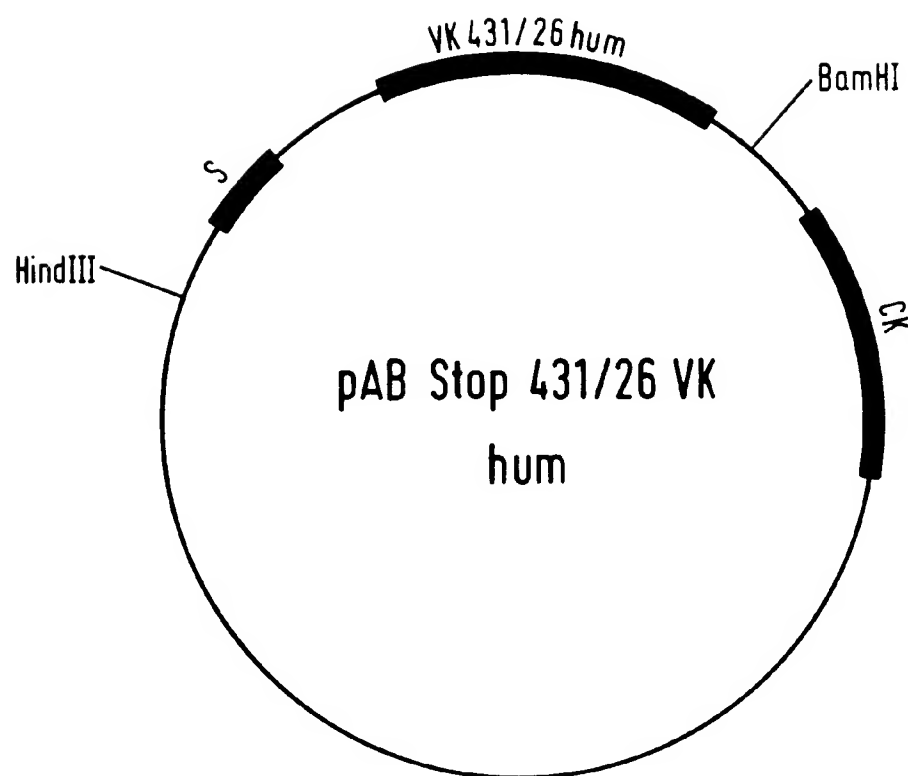


Fig. I

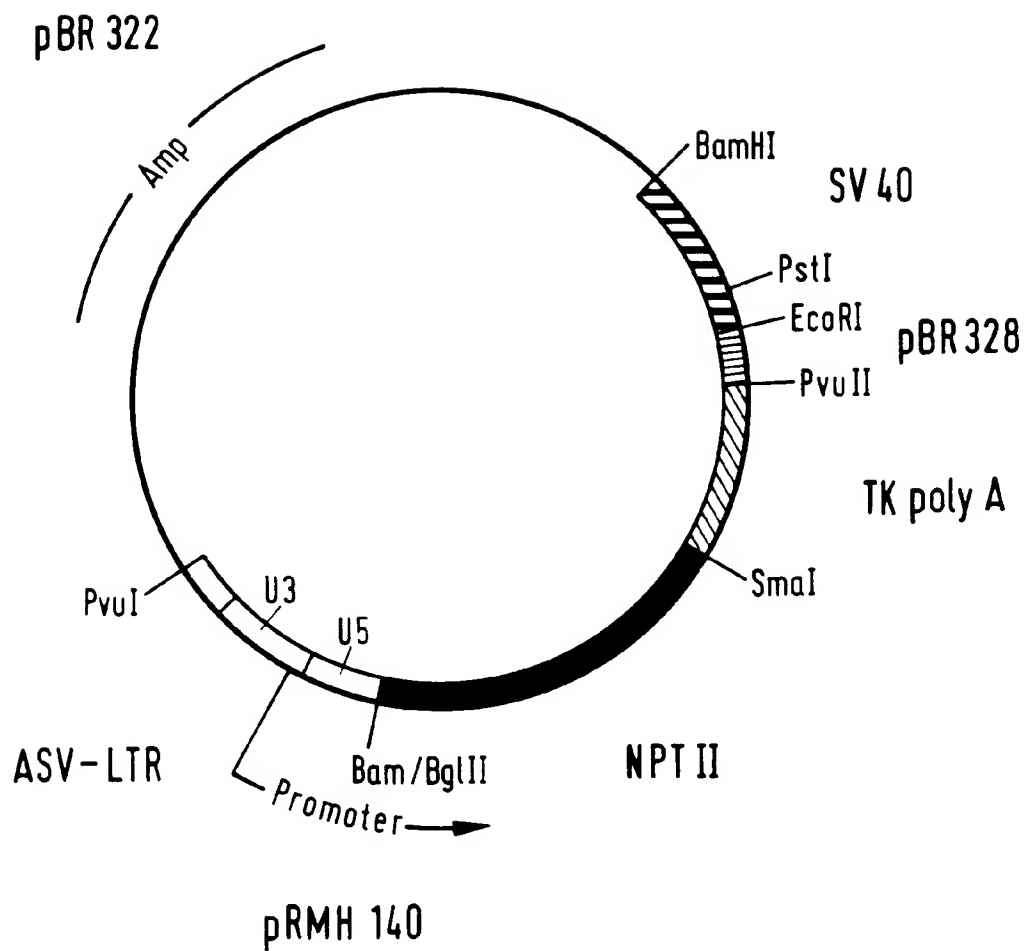


Fig. K



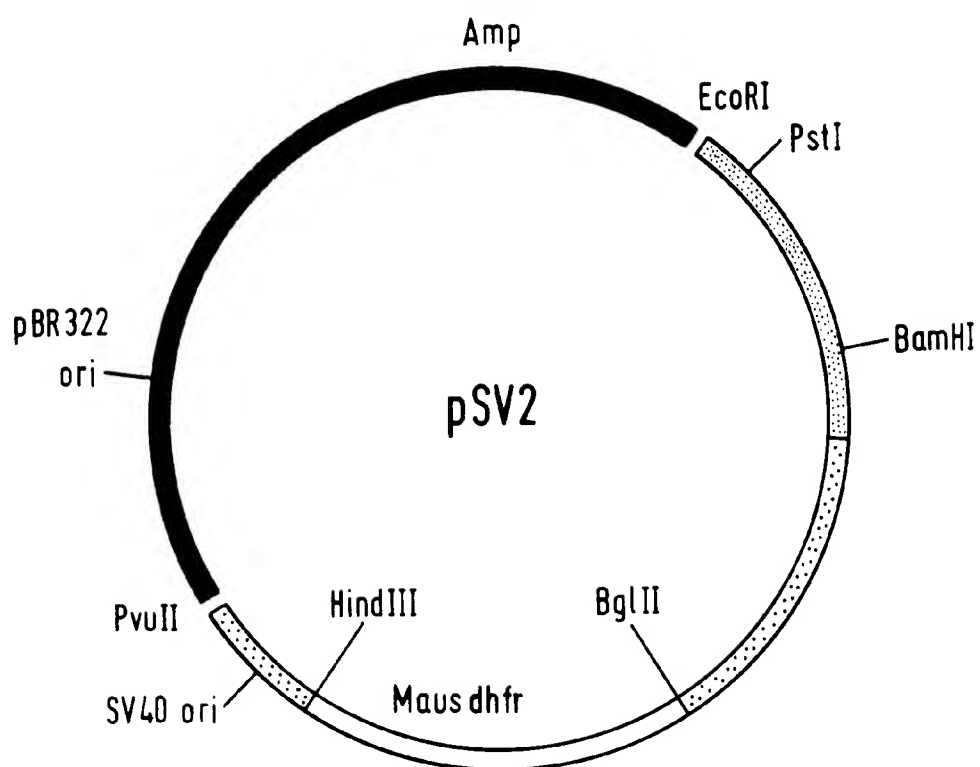


Fig. L

Fig. M

